

バイオフィーマティクスを応用した新規血管作動性ペプチドの探索

●七里 眞義¹⁾ ◆平田 結喜緒²⁾

1) 東京医科歯科大学医学部附属病院 2) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

〈研究の目的と進め方〉

既存のヒト全長cDNAライブラリーのデータベースを主に用いて構造解析を行い、分泌蛋白をコードし小分子量蛋白にプロセシングされ、生理活性ペプチドとなる可能性がある配列のcDNAを効率よく培養細胞に発現させて、分泌される培養上清が生理活性を示すものの中から、ヒト主要臓器や血管系細胞に発現が確認される配列を選択したうえで、生合成されることが推定されるペプチドを化学合成し、血管作動性因子・循環調節性因子類似の細胞内応答、生理作用を示すものについて詳細な検討を行うこととした。対象を比較的小分子量のペプチドにプロセシングされる配列に限定して機能評価を行い、有用な生理活性を有する新規因子の同定をめざした。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 構造解析によるcDNAの選択と発現の確認：ヒト全長cDNAデータベース上の遺伝子構造解析から生理活性因子として矛盾しない配列を有するものを選択する。個々の遺伝子配列をもとにRT-PCR用primerを作成し、ヒト主要臓器や血管系細胞に発現しているかどうか検討する。
- 2) 第一次スクリーニング：経受容体高効率遺伝子導入法を改良した上で、選択されたcDNAを血管内皮細胞等の培養細胞系に導入し、培養上清が生理作用を示すものを選択する。
- 3) ペプチド合成と第二次スクリーニング：生理活性を有するcDNAがコードし、プロセシングされて生合成されると期待されるペプチドを化学合成した上、血管平滑筋細胞における初期応答遺伝子の誘導活性、細胞内Ca²⁺上昇作用を示すものを血管作動性因子候補ペプチドとして選択する。
- 4) 詳細な生理活性の検討：上記にて選択されたペプチドの中から①摘出ラット大動脈標本における血管収縮/弛緩活性を示すもの、②麻酔下ラットにおいて全身血圧や心機能を制御するペプチドを捜す。いずれかの作用を有するものについて様々なアッセイ系を用いて詳細な作用を検討する。

〈研究期間の成果〉

- 1) 小分子量ペプチドにプロセシングされうる分泌性蛋白をコードする遺伝子をバイオフィーマティクスにて選択し、ヒト主要組織における発現分布をRT-PCRにて解析した。選択された100以上の全長cDNA配列を入手し、検討した。
- 2) 全長cDNAを細胞系に簡便に導入・発現させるための経受容体高効率遺伝子導入法を改良して検討した結果、20を越えるcDNAの導入細胞培養上清に何らかの生理活性を認めた。
- 3) これらの蛋白からプロセシングされうるペプチド配列の簡易化学合成を試みた。合成可能であったペプチドのうち、数個の関連ペプチドについては血管平滑筋細胞において、著明な初期応答遺伝子の誘導活性、細胞内Ca²⁺上昇作用を示した。
- 4) これらの合成ペプチドを高純度に精製しin vivoにおける作用を検討した。比較的多数の配列の構造解析に始まり生理活性のスクリーニングによって獲得した新規ペプチドについて、研究期間終了後も継続して生理活性や生体内での発現、最終的な存在様式などについて詳細に検討し、後述の複数の新規生理活性因子を発見

することができた。これらは血管作動性因子様の細胞内シグナルを示したが、最終的な強力な活性は心機能を制御する循環調節性因子であった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

バイオフィーマティクス解析を用いて系統的に新規生理活性因子を同定する試みは、当時から内外で随一であったと思われ、2002年度の本研究を進展させた結果、新規内因性多機能性ペプチドホルモンであるサリューション- α およびサリューション- β の同定に成功した。とくにサリューション- β は最強の内因性降圧因子であったばかりでなく、その後、視床下部・下垂体系を介した神経内分泌機構により血中に放出され、体液制御にも関与することが明らかにされるなど反響が広がっている。さらに官民一体型国家的プロジェクトにて作成された全長濃縮cDNAライブラリーを活用してバイオフィーマティクスを用いる新たな手法によって新規因子の同定に至った初めての研究成果として評価されており、国際的にはNature Medicine誌に掲載された。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

1年間という短期間では多くの因子を網羅的かつ詳細に検討することは困難であり、上記の2つの関連ペプチドの発見に繋がる重要な基盤的研究ができたにとどまった。構造解析を丁寧に行い簡易合成した候補ペプチドに有用な活性が認められても、疎水性や等電点などの問題で高純度ペプチドへ精製が困難であったり、複数のCysteinの存在によりS-S結合の生体内での様式が推測出来なかったなどの問題が生じ、活性を示したペプチドであっても詳細な検討を断念せざるを得ないケースも多数あったため、新規因子の発見のペースは当初期待したよりも遅かったといえる。しかし、このような困難にもかかわらず、本研究によって本法の有用性は証明されたと言っても過言ではない。

〈今後の課題〉

本研究は2002年度の単年度のみであったが、その後の方法論の発展と研究の継続により、多数の新規生理活性因子が同定されつつあり、それらの正確な機能解析が課題となっている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Matsushita M, Shichiri M, Fukai N, Ozawa N, Yoshimoto T, Takasu N, Hirata Y: Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for porcine renal epithelial cell line, LLCPK1. *Endocrinology* 2003;144:1825-31
2. Shichiri M, Fukai N, Ozawa N, Iwasaki H, Hirata Y: Adrenomedullin is an autocrine/paracrine growth factor for rat vascular smooth muscle cells. *Regulatory Peptides* 2003;112:167-73
3. Shichiri M, Tanaka A, Hirata Y: Intravenous gene therapy for familial hypercholesterolemia using ligand-facilitated transfer of a liposome:LDL receptor gene complex. *Gene Therapy* 2003;10:827-31
4. Shichiri M, Ishimaru S, Ota T, Nishikawa T, Isogai T, Hirata Y: Salusins; newly identified bioactive peptides with hemodynamic and mitogenic activities. *Nature Medicine* 2003;9:1166-72